



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 43 042 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 100 43 042.2
㉔ Anmeldetag: 1. 9. 2000
㉕ Offenlegungstag: 21. 3. 2002

㉑ Int. Cl.⁷:
B 01 L 3/00
G 01 N 1/28
G 01 N 33/48
G 01 N 33/543
C 12 M 1/42

DE 100 43 042 A 1

㉑ Anmelder:
Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, DE

㉒ Erfinder:
Schürenberg, Martin, 27412 Tarmstedt, DE;
Franzen, Jochen, 28359 Bremen, DE

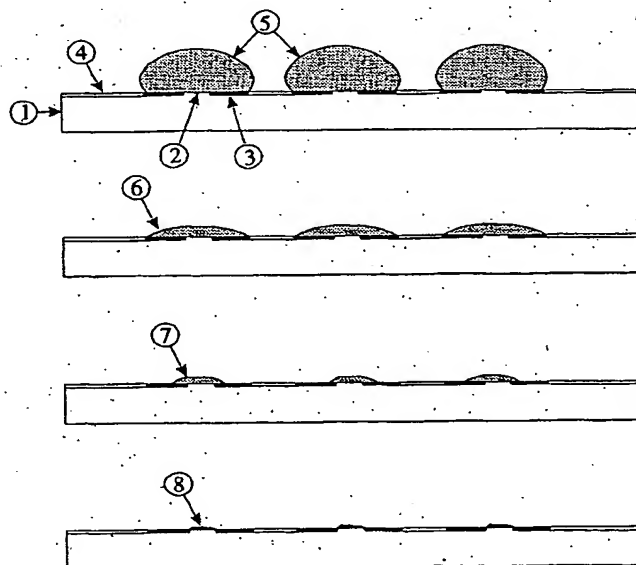
㉓ Entgegenhaltungen:
DE 197 54 978 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉔ Strukturierte Bioprobenträger für massenspektrometrische Analysen nebst Verfahren zur Herstellung und Beladung

㉕ Die Erfindung betrifft Probenträger mit hydrophilen Ankern in lyophober Umgebung für die massenspektrometrische Analyse von Biosubstanzen mit Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI), Verfahren zur Herstellung der Probenträger und Verfahren zum Beladen der Probenträger mit Biomolekül-Proben. Die Erfindung besteht darin, benachbart zu den hydrophilen Ankern Bereiche mit Affinitätssorbentien anzuordnen, die zur Aufreinigung der Biosubstanzen und gegebenenfalls auch zu einer Affinitätsselektion der Biosubstanzen benutzt werden, wobei die Präparation der Biosubstanzen für die MALDI-Analyse gut lokalisiert auf den hydrophilen Ankern stattfindet.



DE 100 43 042 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Probenträger mit hydrophilen Ankern in lyophober Umgebung für die massenspektrometrische Analyse von Biosubstanzen mit Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI), Verfahren zur Herstellung der Probenträger und Verfahren zum Beladen der Probenträger mit Biomolekül-Proben.

[0002] Die Erfindung besteht darin, benachbart zu den hydrophilen Ankern Bereiche mit Affinitätsorbentien anzuordnen, die zur Aufreinigung der Biosubstanzen und gegebenenfalls auch zu einer Affinitätsselektion der Biosubstanzen benutzt werden, wobei die Präparation der Biosubstanzen für die MALDI-Analyse gut lokalisiert auf den hydrophilen Ankern stattfindet.

Stand der Technik

[0003] Für die Analyse von großmolekularen Biosubstanzen hat sich die Massenspektrometrie mit Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization) als ein Standardverfahren etabliert. Meist werden dazu Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS = Time-Of-Flight Mass Spectrometer) verwendet, es können hier aber auch Ionenzyklotron-Resonanzspektrometer (FT-ICR = Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance) oder Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometer (kurz: Ionenfallen) eingesetzt werden.

[0004] Im folgenden werden die Moleküle der Biosubstanzen, die untersucht werden sollen, einfach "Analytmoleküle" oder "Biomoleküle" genannt. Die Analytmoleküle befinden sich in aller Regel sehr verdünnt in wässriger Lösung, rein oder vermischt mit organischen Lösungsmitteln.

[0005] Zu den Biosubstanzen gehören insbesondere die Biopolymere, aber auch andere großmolekulare Substanzen wie beispielsweise Cortico-Steroide. Unter "Biopolymeren" sollen hier besonders die Oligonukleotide (also Teilstücke des Genmaterials in seinen verschiedenen Ausformungen wie DNA oder RNA), Polysaccharide und Proteine (also die wesentlichen Bausteine der lebenden Welt) verstanden werden, einschließlich ihrer besonderen Analoge und Konjugate, wie beispielsweise Glycoproteine oder Lipoproteine, und einschließlich ihrer durch Enzyme erhaltenen Verdaupeptide.

[0006] Die Auswahl der Matrixsubstanz für MALDI hängt von der Art der Analytmoleküle ab; es sind inzwischen weit über hundert verschiedene Matrixsubstanzen bekannt geworden. Die in hohem Überschuss eingesetzten Matrixsubstanzen haben dabei unter anderem die Aufgabe, die Analytmoleküle möglichst zu vereinzeln und am Probenträger anzubinden, während des Laserschusses durch Bildung einer Dampf Wolke möglichst ohne Anlagerung von Matrix- oder anderen Molekülen in die Gasphase zu übertragen, und schließlich unter Protonierung oder Deprotonierung zu ionisieren. Für diese Aufgabe hat es sich als günstig erwiesen, die Analytmoleküle einzeln in die Kristalle der Matrixsubstanzen bei deren Kristallisation oder zumindest feinverteilt in die Grenzflächenbereiche zwischen den Kriställchen einzubauen. Es scheint dabei wesentlich zu sein, die Analytmoleküle voneinander zu trennen, also keine Cluster von Analytmolekülen in der aufgetragenen Probe zuzulassen.

[0007] Für das Auftragen von Analyt und Matrix sind eine Reihe verschiedenartiger Methoden bekannt geworden. Die einfachste davon ist das Aufpipettieren einer Lösung mit Analyt und Matrix auf einen gereinigten, metallischen Probenträger. Der Lösungstropfen bildet auf der Metalloberfläche (oder seiner Oxidschicht) eine Benetzungsfläche, deren

Größe auf hydrophilen Oberflächen einem Mehrfachen eines Tropfendurchmessers entspricht. Die Größe hängt von der Hydrophilität und der Mikrostrukturierung der Metalloberfläche und von den Eigenschaften des Tröpfchens, insbesondere des Lösungsmittels, ab. Es bildet sich dabei nach dem Auftrocknen der Lösung ein Probenfleck aus kleinen Matrixkriställchen in der Größe dieser Benetzungsfläche, wobei sich in der Regel aber keine gleichmäßige Belegung der Benetzungsfläche zeigt. Die Kriställchen der Matrix beginnen in wässrigen Lösungen in der Regel am Innenrand der Benetzung auf der Metallplatte zu wachsen. Sie wachsen zum Inneren der Benetzungsfläche hin. Häufig bilden sie strahlenartige Kristalle, wie zum Beispiel bei 5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder 3-Hydroxypicolinsäure (HPA), die sich zum Inneren des Flecks hin oft von der Trägerplatte abheben. Das Zentrum des Flecks ist häufig leer oder mit feinen Kriställchen bedeckt, die aber oft wegen ihrer hohen Konzentration an Alkalisalzen kaum für die MALDI-Ionisierung brauchbar sind. Die Beladung mit Analytmolekülen ist sehr ungleichmäßig. Diese Belegungsart erfordert daher während der MALDI-Ionisierung eine visuelle Betrachtung der Probenträgeroberfläche durch ein Videomikroskop, das an allen kommerziell hergestellten Massenspektrometern für diese Art von Analysen zu finden ist. Ionenausbeute und Massenauflösung schwanken im Probenfleck von Ort zu Ort. Es ist oft ein mühsamer Vorgang, eine günstige Stelle des Probenflecks mit guter Analytionenausbeute und guter Massenauflösung zu finden, und nur Erfahrung und Ausprobieren hilft hier bisher weiter.

[0008] Es gibt zwar Steuerprogramme für Massenspektrometer mit Algorithmen zum automatisierten Aufsuchen der besten Flecken für die MALDI-Ionisierung, doch sind diese Verfahren mit ihren vielen Versuchen und Bewertungen notwendigerweise recht langsam.

[0009] Bei anderen Auftragungsmethoden ist die Matrixsubstanz bereits vor dem Aufbringen der Lösungsmitteltröpfchen, die nun nur die Analytmoleküle enthalten, auf der Trägerplatte vorhanden.

[0010] Ist die Oberfläche der Probenträgerplatte nicht hydrophil, sondern hydrophob, so werden zwar kleinere Kristallkonglomerate gebildet, aber die Tröpfchen tendieren dazu, beim Eintrocknen in unkontrollierbarer Weise zu wandern. Der Ort der Kristallkonglomerate ist daher nicht vorauszusagen und erfordert eine Suche beim MALDI-Prozess. Außerdem besteht die große Gefahr, dass sich Tröpfchen vereinigen und so eine getrennte Analyse der Proben unmöglich machen.

[0011] Analysen von Bioproben fallen inzwischen zu Tausenden an und verlangen automatische Hochdurchsatzmethoden. Eine visuelle Steuerung oder Suche, auch eine automatisierte Suche, steht aber einem Hochdurchsatzverfahren entgegen.

[0012] Es ist nun beim Antragsteller eine Methode entwickelt worden, die mit kleinen hydrophilen Ankerbereichen von etwa 100 bis 800 Mikrometer Durchmesser in einer ansonsten hydrophoben Oberfläche zu orts- und größen-definierten Kristallisierungsbereichen führt (DE 197 54 978 C2). Die wässrigen Tropfen werden durch die hydrophilen Anker festgehalten und am Wandern gehindert, auch wenn sie durch ihr Gewicht auf den umliegenden lyophoben Bereichen aufliegen. Beim Eintrocknen ziehen sich die Tröpfchen auf den Anker zurück, und es entstehen genau auf diesen Ankern relativ dichte und homogen verteilte, je nach Art und Konzentration der Matrixsubstanz auch geschlossene Kristallkonglomerate. Es konnte gezeigt werden, daß sich dem verkleinerten Oberflächenverhältnis der Benetzungsfläche entsprechend die Nachweisgrenze für Analytmoleküle verbessert. Es kann daher bei der Proben-

aufbereitung mit kleineren Analytmengen und verdünnteren Lösungen gearbeitet werden, ein Vorteil, der sich in besser ablaufenden biochemischen Vorbereitungsschritten niederschlägt und zu niedrigeren Kosten beim Chemikalienverbrauch führt. Bei geeigneter Präparation ist die Empfindlichkeit der Analyse über die Fläche der Probe hinweg sehr gleichförmig. Daher kann der Ionisierungsvorgang durch "blindes" Beschießen der Kristallkonglomerate mit den desorbierenden Laserblitzen von der visuellen oder automatisierten Suche nach günstigen Stellen befreit und daher beschleunigt werden.

[0013] Die Kristallkonglomerate, die sich auf den hydrophilen Ankerflächen bilden, zeigen eine feinkristalline Struktur, die günstig für den MALDI-Prozess ist. Die Struktur wird umso feiner, je schneller der Trocknungsvorgang ist.

[0014] Es soll hier unter einer "hydrophoben" Oberfläche eine für wässrige Lösungen benetzungsfeindliche, also eine wasserabweisende Oberfläche verstanden werden. Entsprechend verstehen wir unter "hydrophil" eine leicht durch Wasser benetzbare Oberfläche. "Oleophob" und "oleophil" (auch manchmal "lipophob" und "lipophil" genannt) sollen Oberflächen heißen, die ölabweisend beziehungsweise ölbetzbar sind. Organische Lösungsmittel, die nicht mit Wasser mischbar sind, haben in diesem Sinne der Benetzbarkeit meist einen Ölsardine Charakter, das heißt, sie benetzen oleophile Flächen. Sie sind in der Regel mit Öl mischbar. Organische Lösungsmittel, die mit Wasser mischbar sind, wie beispielsweise Methanol, Aceton oder Acetonitril, können in reinem Zustand sowohl oleophile wie auch hydrophile Oberflächen benetzen, die Benetzbarkeit von oleophilen Oberflächen verliert sich aber mit steigendem Gehalt an Wasser.

[0015] Es herrschte lange Zeit die Anschauung, dass hydrophobe Oberflächen immer auch oleophil, und umgekehrt oleophobe Oberflächen immer auch hydrophil seien. Seit einigen Jahren ist jedoch bekannt, dass es auch Oberflächen gibt, die sowohl hydrophob wie auch oleophob sind, beispielsweise glatte Oberflächen aus perfluorierten Kohlenwasserstoffen wie etwa Polytetrafluorethen (PTFE). Solche Oberflächen werden hier als "lyophob" bezeichnet, einem Begriff, der der Kolloidwissenschaft entnommen ist.

[0016] Es ist in jüngster Zeit auch bekannt geworden, dass der benetzbare oder flüssigkeitsabweisende Charakter einer Oberfläche auch sehr stark von seiner Mikrostrukturierung abhängt. Ein Beispiel dafür ist der so genannte "Lotus-Effekt" (benannt nach der Lotos-Pflanze).

[0017] Die Hydrophobizität (Oleophobizität, Lyophobizität) kann im Prinzip aus dem Anstellwinkel (auch Randwinkel oder Kontaktwinkel genannt) ermittelt werden, den die Flüssigkeit unter normierten Bedingungen am Rande der Benetzungsfläche mit der festen Oberfläche ausbildet. In einem absoluten Sinn wird eine Oberfläche eines Materials dann hydrophob (oleophob, lyophob) genannt, wenn der Kontaktwinkel des Flüssigkeitsspiegels in einer Kapillare aus diesem Material größer als 90° ist. Diese Definition ist schwer auf den Anstellwinkel eines auf einer ebenen Fläche aufsitzenden Tröpfchens zu übertragen, da hier die Tröpfchengröße eine größere Rolle spielt. Im Folgenden werden daher die Begriffe nicht im absoluten, sondern in einem relativen Sinn gebraucht: eine Oberfläche ist gegenüber einer Flüssigkeit hydrophober als eine andere Oberfläche, wenn der Anstellwinkel größer ist. In Allgemeinen wird hier eine Oberfläche schon dann als hydrophob angesehen, wenn der Anstellwinkel zwar kleiner als 90° ist, aber ein Tropfen auf der Oberfläche nicht zu einer großen Benetzungsfläche verläuft. Insbesondere sprechen wir dann von einer hydrophoben Oberfläche, wenn sich ein Tropfen auf einer Oberfläche

beim Trocknen oder Aufsaugen mit einer Pipette unter Verkleinerung der Benetzungsfläche und Zurücklassen einer trockenen Fläche zusammenzieht (so genannte "dynamische Hydrophobie"). Eine solche dynamische Hydrophobie findet insbesondere bei sehr glatten Oberflächen, Mikrostrukturierungen jeder Art stehen solchen Effekten entgegen. In der Regel lösen sich die Biomoleküle am besten in Wasser, manchmal unter Zugabe von organischen, wasserlöslichen Lösungsmitteln wie Alkoholen, Aceton oder Acetonitril. Die Lösungen von Biomolekülen enthalten darüberhinaus je nach Herstellung weitere Substanzen, wie Glykole, leimartige Puffersubstanzen, Salze, Säuren oder Basen. Der MALDI-Prozess wird durch die Anwesenheit dieser Fremdstoffe erheblich gestört, zum Teil durch Verhinderung der Protonierung, zum Teil durch Adduktbildung. Insbesondere bilden Alkaliionen häufig Addukte wechselnder Größe mit den Analytmolekülen und verhindern so eine genaue Massenbestimmung. Die Konzentration an Alkaliionen in der Probepräparation, aber auch die Konzentration anderer Substanzen muss daher durch sorgfältige Aufreinigung niedrig gehalten werden.

[0018] Für die Reinigung – und gleichzeitig für eine Aufkonzentration der Biomoleküle – benutzt man so genannte Affinitätssorbentien, ähnlich denen, die in der Affinitätschromatographie benutzt werden. Während man sich jedoch in der Affinitätschromatographie möglichst bioselektiver, also auswählender, Affinitätssorbentien bedient, braucht man zum Reinigen der zunächst unbekannten Gemische von Biopolymeren möglichst unspezifische Sorbentien, also Sorbentien, die alle biomolekularen Mischungsbestandteile in möglichst gleicher Weise binden.

[0019] Für die Aufreinigung von Peptid-, Protein- oder DNA-Mischungen haben sich bisher besonders schwammartige Mikrokügelchen aus Sorbens-Material (Poros®, PE BioSystems), mit schwammartigem Sorbens gefüllte Pipettenspitzen (ZipTips®, Millipore) oder magnetisierbare Kügelchen mit C18-Belegung bewährt. Diese Materialien sind alle stark oleophil und binden Peptide oder Oligonukleotide über hydrophobe Bindungen. Die Biomoleküle lassen sich in der Regel durch wässrige Methanol- oder Acetonitril-Lösungen eluieren; die Eluierung kann oft auch durch Änderung des pH-Wertes vorgenommen werden. Die Reinigung mit diesen Materialien ist jedoch aufwendig, weil sie zusätzliche Materialien und zusätzliche Verfahrensschritte erfordert.

[0020] Umgekehrt oder auch zusätzlich kann man auch die schädlichen Kationen durch Versatz mit Ionenaustauschern binden. Auch hier ist im Hause ein Verfahren entwickelt worden (DE 199 23 761).

Aufgabe der Erfindung

[0021] Es ist die Aufgabe der Erfindung, durch eine besondere Ausprägung der MALDI-Probenenträgerplatten und durch besondere Belegungsverfahren das Reinigen der Biopolymere von Puffersubstanzen, Säuren, Laugen und Salzen auf dem Probenenträger selbst vorzunehmen zu können. Es ist vorteilhaft, wenn dabei für spezielle Analysenaufgaben auch eine Selektion der Biosubstanzen vorgenommen werden kann.

Zusammenfassung der Erfindung

[0022] Es ist der Grundgedanke der Erfindung, die Oberfläche eines ansonsten wasser- und ölabweisenden (lyophoben) Probenenträgers mit kleinen, geschlossenen, wasserbenetzungsfreundlichen (hydrophilen) Belegungsbereichen als Anker für die Probetröpfchen zu versehen, wie schon

beim Antragsteller methodisch bis zur Produktreife entwickelt, aber benachbart zu den hydrophilen Ankern Bereiche mit hydrophoben Affinitätssorbentien (das sind biospezifische affinitätschromatographische Phasen) zu installieren, die Biosubstanzen aus wässriger Lösung binden und bei Benutzung mit so genannten Eluierungsmitteln wieder in Lösung geben können.

[0023] Die hydrophilen Ankerbereiche werden dabei so klein gewählt, dass beim Aufbringen von Probetropfen deren Auflagebereich auf dem Probenträger mit dem Affinitätsbereich überlappt. Dabei werden die Biomoleküle in diesem Bereich gebunden. In gebundenem Zustand lassen sich die Biomoleküle mit nichteluierenden Flüssigkeiten waschen.

[0024] Ein solcher Bereich mit Affinitätssorbens bildet günstigerweise einen Ring um den hydrophilen Anker. Um den Ring herum erstreckt sich dann der lyophobe Oberflächenbereich der Probenträgerplatte.

[0025] Die Eluierungslösung ist gewöhnlich eine Mischung eines organischen Lösungsmittels mit Wasser, kann aber auch ganz anders zusammengesetzt sein, beispielsweise, wenn die Eluierung pH-Wert-gesteuert ist. Für die MALDI-Präparation enthält die Eluierungslösung zusätzlich auch die Matrixsubstanz. Die Tröpfchen mit Eluierungsflüssigkeit benetzen den Affinitätsbereich; die Biomoleküle gehen in Lösung. Während des Eintrocknens der Eluierungslösung ziehen sich deren Tröpfchen zunehmend von den Affinitätssorbentien auf die hydrophilen Ankerbereiche zurück, dabei werden die Biomoleküle in die Matrixkriställchen eingebaut, die sich auf den hydrophilen Ankerflächen bilden.

[0026] Die Affinitätssorbentien können dabei je nach Analysenaufgabe sehr bioselektiv auf einige wenige Arten von Biosubstanzen, oder aber sehr unselektiv auf eine hohe Anzahl von Biosubstanztypen ausgerichtet sein. Zum Reinigen von Peptid- oder Oligonukleotid-Gemischen sind insbesondere unselektive Affinitätssorbentien geeignet; diese wirken über relativ unselektive hydrophobe Bindungen.

[0027] Beispielsweise können für die unselektive, hydrophobe Bindung von Peptiden, Proteinen oder Oligonukleotiden oberflächengebundene Alkanketten in Längen von vier bis 18 Kohlenstoffatomen (oder darüber hinaus) verwendet werden: so genannte C4- bis C18-Belegungen. Die Alkanketten können beispielsweise über Schwefelbrücken direkt an Metalloberflächen kovalent angebunden sein. Für den Fall extrem selektiver Affinitätssorbentien können hier Belegungen mit Antikörpern genannt werden, die in einfacher Weise an eine dazu vorbereitete Molekülschicht gebunden wird, die selbst wiederum kovalent an die Plattenoberfläche gebunden ist. Für Oligonukleotide können beispielsweise Belegungen mit biotinierten Gegensträngen verwendet werden, die leicht über Streptavidin-Biotin-Bindungen an oberflächengebundenes Streptavidin gebunden werden. Hier kann die Biotin-Streptavidin-Bindung sogar wieder rückgängig gemacht werden, um danach die Streptavidin-Schicht mit anderen Gegensträngen zu belegen.

[0028] Eine Oberfläche von nur einem Quadratmillimeter reicht aus, um viele Picomole an Analytsubstanzen zu binden. Dabei entsteht eine Belegungsdichte, die nur einem winzigen Bruchteil einer monomolekularen Schicht entspricht. Die MALDI-Analyse gelingt aber schon mit etwa einem Femtomol jeder der vorhandenen Substanzen.

[0029] Die Ankerflächen können zusätzlich mit kationenaustauschenden und damit stets hydrophilen Materialien belegt sein, um auch letzte Reste von Kationen zu entziehen.

[0030] Die Probenträgerplatten können bei vorsichtigem Reinigen vielfach wiederverwendet werden. Die Anzahl der Verwendungen hängt zuvörderst von der Verunreinigung

mit meist großmolekularen, stark hydrophoben Substanzen ab, die sich nicht mehr aus den oleophilen Bereichen auswaschen lassen.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0031] Abb. 1A zeigt eine metallische Probenträgerplatte (1) mit hydrophilen Ankern (2) und Affinitätsbereichen (3) in lyophiler Umgebung (4), mit aufpipettierten Probentropfen (5), die durch ihre Schwerkraft große Teile der Affinitätsbereiche überdecken, so dass dort die Biomoleküle affin gebunden werden. Die Affinitätsbereiche sind beispielsweise mit C18 belegt. Die hydrophilen Anker werden von der unbedeckten Metalloberfläche gebildet, organisch-anorganische Nanokompositmaterialien bilden eine lyophobe Schicht von etwa 4 Mikrometer Dicke.

[0032] Abb. 1B zeigt dieselbe Probenträgerplatte nach dem Waschen, Trocknen, und Aufbringen der viel kleineren Eluierungsflüssigkeitströpfchen (6), die den Affinitätsbereich benetzen und die Biomoleküle wieder in Lösung bringen. Die Eluierungsflüssigkeit besteht hier beispielsweise aus 95% Acetonitril mit 5% Wasser, in der etwa 0,5% Matrixsubstanz gelöst sind.

[0033] Abb. 1C stellt die Eluierungsflüssigkeitströpfchen (7) während des Eintrocknens dar. Da im Wesentlichen zunächst nur Acetonitril verdunstet, beträgt die Mischung bei einer Volumenminderung auf 10% des ursprünglich aufpipettierten Volumens jetzt etwa 50% Acetonitril und 50% Wasser, in der die Matrixsubstanz gelöst ist. Diese Lösung wirkt immer noch eluierend, hält also die Biomoleküle in Lösung, zieht sich aber bereits von den Affinitätsbereichen zurück.

[0034] Abb. 1D zeigt den Zustand eingetrockneter Eluatlösung mit den Matrixkristallkonglomeraten (8) auf den hydrophilen Ankern. Die Biomoleküle befinden sich nun größtenteils in den Kristallkonglomeraten.

Besonders günstige Ausführungsformen

[0035] Es werde hier zunächst die günstige Herstellung von Bioprobenträgern mit Reinigungsfunktionen und deren Form beschrieben. Danach werden entsprechende, aufreinernde Belegungsverfahren dargelegt.

[0036] Die gut gereinigten, fettfreien Oberflächen normalerweise für MALDI-Proben verwendeter metallischer Probenträger sind in der Regel von Natur aus leicht hydrophil gegenüber den wässrigen Probenlösungen, ein Probentropfen fließt normalerweise zu einer Fleckgröße auseinander, die einem Mehrfachen des Tröpfchendurchmessers entspricht. Die Hydrophilität wird durch die Hydroxygruppen erzeugt, die sich unter der Einwirkung von feuchter Luft auf jedem Metall (selbst auf Edelmetallen) bleibend bilden.

[0037] Es ist aus Gründen einfacher Herstellung durchaus zweckmäßig, für diese Erfindung bei Probenträgern aus Metall oder metallisiertem Kunststoff zu bleiben, und auch diese Metalloberfläche als hydrophile Ankerflächen ohne weitere Beschichtung zu belassen. Die metallische Grundlage bestimmt das Beschleunigungspotential für die Beschleunigung der durch den nachfolgenden MALDI-Prozess erzeugten Ionen. Als besonders günstig haben sich hochlegierte Edelstähle, aber auch reine Nickeloberflächen erwiesen. So können beispielsweise Probenträgerplatten aus vernickeltem Druckguss-Aluminium hergestellt werden.

[0038] Die Oberfläche der Probenträger außerhalb der hydrophilen Anker und der später mit Affinitätssorbentien zu belegenden Bereiche muss nun lyophob gemacht werden.

[0039] Es sind in jüngster Zeit mehrere Verfahren zur Erzeugung der lyophoben Oberflächen bekannt geworden. Ne-

ben der bereits bekannten Beschichtung mit perfluorierten Substanzen wie PTFE (beispielsweise mit Teflon®) gibt es Beschichtungen mit organisch-anorganischen Sol-Gel Nanocompositmaterialien (DE 41 18 184), siehe beispielsweise R. Kasemann, H. Schmidt, S. Brück, Bol. Soc. Esp. Ceram. Vid. 31-6, Vol. 7, (1992), 75. Die Nanocompositmaterialien lassen sich auf Metallen, Glas oder Kunststoffen als wenige Mikrometer dünne, sehr glatte, kratz feste Schichten einbrennen. Die Beschichtungen mit PTFE sind in Allgemeinen nicht so dünn und eben wie die der Nanocompositmaterialien, sie sind im Allgemeinen weniger gut zu gebrauchen, weil sie meist mehrere hundert Mikrometer dick sind und daher eine Neigung zu starken elektrischen Aufladungen während der MALDI-Ionisierung zeigen.

[0040] Durch ein besonderes Bedruckungsverfahren mit wiederauflösbaren Schutzlacken können dabei zunächst die späteren Anker- und Affinitätsflächen geschützt werden, beispielsweise durch Aufdrucken von runden Flächen mit etwa 1,4 Millimeter Durchmesser. Nach Aufsprühen der Nanocompositlösung und ihrem Einbrennen werden die lösbar Lacke entfernt; es werden dabei die bedruckten Bereiche wieder freigelegt. Die Schutzlackflecken bestimmen die äußeren Durchmesser der späteren Affinitätsringe. Es haben sich dafür Durchmesser von etwa 0,8 bis etwa 2 Millimeter bewährt, besonders günstig sind Durchmesser von etwa 1,2 bis 1,5 Millimeter.

[0041] In einem zweiten Bedruckungsverfahren werden nun die später hydrophilen Ankerbereiche mit löslichem Schutzlack bedruckt, beispielsweise als runde, jeweils zentral in den späteren Affinitätsbereichen sitzende Flächen mit je etwa 0,4 Millimeter Durchmesser. Um genügend kleine Punkte zu erhalten, kann der Schutzlack beispielsweise in Form kleinster Tröpfchen mit einer piezobetriebenen Tröpfchenpipette nach Art der Tintenstrahl-Drucker aufgeschossen werden, aber auch Siebdruckverfahren haben sich bewährt. Es ist mit beiden Verfahren eine außerordentlich gute Ortspräzision der Lackpunkte erreichbar. Diese Ortspräzision ist für eine später automatisch ablaufende MALDI-Analyse besonders vorteilhaft.

[0042] Die hydrophilen Ankerflächen haben zweckmäßigerweise Durchmesser zwischen 100 und 500 Mikrometern, solche von 200, 300 und 400 Mikrometern haben sich für verschiedenartige Anwendungen als besonders günstig erwiesen.

[0043] Danach werden die Ringe um diese mit Schutzlack bedruckten Ankerbereiche herum mit den Affinitätsorbentien belegt. Die Techniken zur Belegung sind dem chromatographisch erfahrenen Fachmann im Prinzip bekannt. Im Falle einer Belegung mit C18-Alkanen kann die freigebliebene Metalloberfläche um die späteren Ankerbereiche herum beispielsweise durch eine selbstorganisierende Belegung mit Alkanthioaten aus wässriger Lösung bedeckt werden. Die Alkanketten binden sich dabei kovalent in bekannter Weise selbsttätig über endständige Schwefelbrücken direkt an die Metalloberfläche an. Die Bindung ist sehr stabil. Eine besonders gute Bindung erhält man, wenn diese Flächen zuvor elektrolytisch vergoldet werden. Es gibt jedoch auch andere Belegungsverfahren mit Alkanketten, beispielsweise durch ein elektrisches Plasma.

[0044] Ein Auflösen der Schutzlackflecken auf den Ankerbereichen vervollständigt die Herstellung der Bioprobe-trägerplatten mit Reinigungsfunktion. Diese Proben-träger haben nun zentrale, metallische, hydrophile Anker mit etwa 0,4 Millimetern Durchmesser, darum herum jeweils ringförmige Bereiche mit Affinitätsorbentien, für selektionsfreie Aufreinigung von Peptidgemischen beispielsweise eine C18-Belegung, mit äußeren Durchmessern von etwa 1,4 Millimetern.

[0045] In einer Weiterbildung der Erfindung können die hydrophilen Ankerbereiche auch mit ionenaustauschenden Schichten belegt werden. So kann beispielsweise Nafion® in Lösung aufgetragen werden. Die Lösung bildet auf den hydrophilen Ankern kleine Tröpfchen, die nach dem Verdunsten des Lösungsmittels je einen Nafion-Film zurücklassen. Es kann aber auch ein Klebstoff in Lösung aufgetragen werden, der nach fast vollendetem Trocknen mit einem Pulver aus Ionenaustauschermaterial satt überstäubt wird. Wird ein Pulver mit Partikeln von etwa 5 bis 20 Mikrometer Durchmesser (mesh 1000) verwendet, so ergibt sich nach festem Andrücken, Trocknen und kräftigem Waschen eine sehr gleichmäßige Belegung, die eine hohe Aufnahmefähigkeit für Alkaliionen hat. Es ist auch möglich, die Materialien direkt auf der hydrophilen Ankerfläche auszupolymerisieren. Auch hier erleichtert die Hydrophilie der Ankerflächen ein gleichmäßiges Auftragen. Ionenaustauscher sind stets sehr hydrophil, so dass die Ankerflächen auch nach der Belegung mit Ionenaustauschern hydrophil bleiben.

[0046] Die Proben-tröpfchen werden normalerweise mit Pipetten auf die hydrophilen Ankerbereiche dieser MALDI-Bioprobe-träger aufgebracht. Für das gleichzeitige Aufbringen vieler Proben-tröpfchen aus Mikrotiterplatten werden Vielfachpipetten verwendet, die von Pipettenrobotern in Pipettenautomaten bewegt werden (siehe beispielsweise DE 196 28 178).

[0047] Es ist daher besonders günstig, Proben-träger in der Größe von Mikrotiterplatten zu verwenden und das Raster der hydrophilen Ankerbereiche an das Raster der Mikrotiterplatten anzupassen. Es ist weiterhin günstig, wenn die Proben-träger auch die Form von Mikrotiterplatten haben, da sie dann von den handelsüblichen Pipettierrobotern bearbeitet und transportiert werden können. Da auf dem Proben-träger eine höhere Proben-dichte erreicht werden kann, als es in den meistverwendeten Mikrotiterplatten möglich ist, kann das Raster auf dem Proben-träger auch feiner sein, als es dem Raster der Mikrotiterplatte entspricht. Es kann beispielsweise durch ganzzahlige Teilung des Rasters der Mikrotiterplatten erhalten werden. Es können dann auf einen Proben-träger die Proben aus mehreren Mikrotiterplatten aufgebracht werden.

[0048] Das Grundraster der Ur-Mikrotiterplatte besteht aus 96 kleinen Gefäßen im Raster von 9 Millimetern in einer Anordnung von 8 Reihen mal 12 Spalten. Die Form der Mikrotiterplatte ist als Industriestandard festgelegt. Die Mikrotiterplatten sind aber ohne Veränderung ihrer Größe weiterentwickelt worden, moderne Ausführungsformen zeigen 384, 864 oder sogar 1536 Mikrogefäße im Raster von 4,5, 3,0 oder 2,25 Millimetern. Diese Rastermaße lassen sich auch für die Ankerbereiche auf den aufreinigenden Bioprobe-trägern einrichten. In Bezug auf die Tröpfchengröße der bequem mit Pipettierrobotern handzuhabenden Volumen von etwa 2 Mikrolitern erscheinen die beiden Rastermaße mit 4,5 oder 3,0 Millimeter Abstand und 384 bzw. 864 Ankerbereichen auf einem Träger als besonders günstig. Eine Tröpfchengröße von etwa 2 Mikrolitern ist auch deshalb zu bevorzugen, weil diese Tröpfchen gut und sicher mit automatischen Pipetten auf den Ankern abzulegen sind, was für kleinere Tröpfchen durchaus problematisch ist.

[0049] Beim Aufpipettieren eines Tropfens einer Biopolymerprobe in wässriger Lösung mit einem Volumen von etwa zwei Mikrolitern auf einen hydrophilen Anker mit einem Durchmesser von beispielsweise 400 Mikrometern bildet sich ein pilzhutförmiger Tropfen mit einem Durchmesser von etwa 1,5 bis 2 Millimetern aus. Dieser bedeckt und benetzt durch seine Schwerkraft einen größeren Teil des affinitäts-sorptiven oleophilen Rings, der beispielsweise einen Außendurchmesser von etwa 1,4 Millimetern hat. Eine solche

Überdeckung ist in Abb. 1A gezeigt. Die lyophobe Umgebung mit ihrer noch stärkeren Hydrophobizität dagegen wird bei idealer Ausführungsform von Trägerplatte und Belegungsverfahren vom Lösungstropfen nicht mehr benetzt. Beim Eintrocknen des Tröpfchens, bei dem sich sehr starke Strömungen in dem Tropfen ausbilden, die alle Moleküle praktisch vielfach mit der oleophilen Oberfläche des Affinitätsbereichs in Berührung bringen, werden diese durch ihre Affinität zur oleophilen Oberfläche hydrophob gebunden, während die anderen, in der Regel gut wasserlöslichen Lösungsbestandteile erst zuletzt auf der Oberfläche, überwiegend auf den hydrophilen Ankern, abgelegt werden.

[0050] Die Proben-trägerplatte kann vor oder nach vollständigem Eintrocknen der Proben in einfacher Weise mit Waschflüssigkeit, beispielsweise für C18-Belegungen mit sauberem Wasser, abgespült und so von allen leicht wasserlöslichen Substanzen befreit werden. Bei vorsichtigem Spülen mit großem Überschuss an Waschflüssigkeit besteht normalerweise keine Gefahr der gegenseitigen Verunreinigung der Proben. Muss diese Verunreinigung garantiert ausgeschlossen werden, so kann eine individuelle Spülung der einzelnen Ankerbereiche vorgenommen werden, beispielsweise durch eine Pipettenspülung, bei der die Waschflüssigkeit mehrmals aufgebracht und wieder abgesaugt wird. Anschließend wird getrocknet.

[0051] Nach Trocknung werden jetzt als Eluierungsmittel Tropfen organischer Lösungsmittel mit geringem Anteil an Wasser und mit ein wenig gelöster Matrixsubstanz aufpipetiert. Das Lösungsmittel mit etwas Wasser und Matrixsubstanz benetzt sofort die Affinitätsbelegung und es lösen sich die hydrophob gebundenen Biopolymermoleküle in der Matrixlösung. Beim Eintrocknen verdampft zunächst organisches Lösungsmittel (beispielsweise Methanol, Aceton oder Acetonitril), die zunehmend höhere Konzentration an Wasser und das rasch kleiner werdende Volumen lässt den Tropfen (oft ruckweise) immer mehr auf den Anker schrumpfen, bis dann hier die Kristallisation der Matrixsubstanz mit dem Einbau der Analytmoleküle stattfindet.

[0052] Da diese Eluierungsflüssigkeiten auch die Affinitätsbereiche leicht benetzen, können hier viel kleinere Volumina für die Tropfen verwendet werden; diese lassen sich viel leichter aus einer Pipettenspitze auf die Proben-trägerplatte absetzen als rein wässrige Tropfen. Es reichen hier Flüssigkeitsmengen von etwa 200 bis 500 Nanoliter, was etwa Tröpfchendurchmessern von 0,8 bis 1 Millimeter entspricht.

[0053] Bei richtiger Wahl der Dosierung der Lösungen mit Wasser und Matrixsubstanz bleiben nur wenige Biomoleküle auf der Affinitätsbelegung zurück. Die Biomoleküle sind weitgehend in die Matrixkristalle oder ihre zwischenkristallinen Grenzflächen eingebaut.

[0054] Die Aufgabe der Proben-tröpfchen zu Beginn der Belegung erfolgt zweckmäßigerweise, wenn sich die Vielfachpipette im Abstand von 500 bis 800 Mikrometer über dem Proben-träger befindet. Es werden etwa zwei Mikroliter der Probenlösung aus jeder Pipettenspitze der Vielfachpipette auf den Proben-träger pipetiert; der Durchmesser freier Tröpfchen beträgt dann etwa 1,6 Millimeter. Die Pipettenspitzen sollten hydrophob sein, um das Absetzen der Tröpfchen zu erleichtern. Gewöhnlich ist die Menge der Probenlösung in der Pipettenspitze durch ein Gasbläschen abgeschlossen, daher ist im Kanal der Pipettenspitze anschließend keine Lösung mehr vorhanden und die Kontaktkräfte zur hydrophoben Pipettenspitze sind sehr gering. Der Tropfen lässt sich so sicher auf der Proben-trägerplatte absetzen.

[0055] Die eintrocknenden Tröpfchen bilden im Inneren wirbelartig starke Flüssigkeitsströmungen aus, die es mit sich bringen, daß praktisch alle Biomoleküle irgendwann zu

den Affinitätsbereichen gelangen, wo sie affin gebunden und damit festgehalten werden.

[0056] Das Waschen kann beginnen, bevor die Tröpfchen ganz eingetrocknet sind. Damit kann vermieden werden, dass Verunreinigungen erst antrocknen und dann wieder gelöst werden müssen, was manchmal schwierig ist. Abhängig von der Art der Probenaufbereitung und damit von der Art der Verunreinigungen kann aber unter Umständen auch mit dem Waschen bis zum vollständigen Trocknen der Tröpfchen gewartet werden.

[0057] Nach dem Waschen beginnt der Vorgang des Eluierens durch Aufbringen kleiner Mengen an Eluierungsflüssigkeit mit gelöster Matrixsubstanz. Die Art der Matrixsubstanz richtet sich nach der analytischen Aufgabe, es sind hier im Prinzip hunderte von Substanzen bekannt geworden, wenn auch in der Regel nur ein Handvoll davon häufigere Verwendung finden. Diese sind dem massenspektrometrischen Fachmann bekannt.

[0058] Beim Eintrocknen ziehen sich die Tröpfchen der Eluierungsflüssigkeit meist ruckweise immer mehr von den Affinitätsflächen zurück, weil sich die Hydrophobie gegenüber der Affinitätsfläche durch bevorzugtes Verdunsten der organischen Lösungsmittel mehr und mehr vergrößert. Die letzte Phase des Eintrocknens hinterlässt die Kristallkonglomerate mit den Probenmolekülen exakt auf den hydrophilen Ankerbereichen, wie in Fig. 1D schematisch zu sehen ist. Die brockenförmigen MALDI-Präparate haben daher wie gewünscht eine exakte Positionierung an vorbekannten Stellen, ihre Größe kann so eingerichtet werden, dass sie den Fokusflächen der Laserstrahlen entspricht. Sie bieten außerdem eine hohe Ausbeute an Analytionen, und sind somit in idealer Weise für eine automatisch erfolgende Analyse vorbereitet.

[0059] Diese monolitischen Brocken zeigen überraschenderweise eine sehr gute und von Brocken zu Brocken reproduzierbare Ionisierung der eingebrachten Biomoleküle, mindestens gleich gut wie die mit Mühe gesuchten günstigsten Stellen der bisherigen Präparationen. Die Adduktbildung mit Alkaliionen ist deutlich geringer, meist gar nicht mehr zu erkennen. Wahrscheinlich sind die Analytmoleküle in einer für den Desorptions- und Ionisationsprozeß sehr günstigen Lage an den Korngrenzen der mikrokristallinen Gefügestruktur eingebettet.

[0060] Natürlich können die Tröpfchen auch manuell aufgebracht werden, wie es überhaupt viele Verwendungsmöglichkeiten für die hier dargestellten Proben-träger gibt, wie es jedem Fachmann auf diesem Gebiet nach diesen Ausführungen einleuchtend sein wird.

[0061] Aus Natur und Zielsetzung des Reinigungs- und Trocknungsvorgangs folgt, daß bestimmte Zusammensetzungen der Probenlösung zu vermeiden sind. So ist eine Beimengung von Tensiden oder Detergenzien schädlich, weil dadurch eine Benetzung der hydro- oder sogar lyophoben Oberfläche stattfinden kann. Auch hier ist es jedem Fachmann nach diesen Ausführungen verständlich, wie er das Verfahren der Probenvorbereitung und des Aufpipettierens vorzunehmen hat, um eine fehlerhafte Probenaufgabe zu vermeiden.

[0062] Sowohl hydrophobe wie auch hydrophile Oberflächen können bei langer Lagerung in Umgebungsluft ihre Benetzungseigenschaften durch Belegung der Oberflächen mit Verunreinigungen aus der Luft ändern. Es ist daher zweckmäßig, die Proben-träger im Vakuum oder unter sauberem Schutzgas zu lagern.

Patentansprüche

1. Proben-träger mit ebener Oberfläche für die massen-

spektrometrische Analyse von Biomolekülen, die in Lösung als Tröpfchen auf hydrophile Ankerbereiche der ansonsten hydro- oder lyophoben Oberfläche aufgebracht und dort zusammen mit Matrixsubstanz für eine Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption eingetrocknet werden, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich benachbart zu den hydrophilen Ankerbereichen Bereiche mit Affinitätssorbentien für die Biomoleküle befinden.

2. Probenträger nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die hydrophilen Ankerbereiche von den Bereichen mit Affinitätssorbentien ringförmig umschlossen werden.

3. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß er in etwa die Größe und Form einer Mikrotiterplatte besitzt und daß die hydrophilen Ankerbereiche ein Raster bilden, das dem quadratischen Grundraster von 9 Millimetern für die Einzelgefäße einer Mikrotiterplatte oder einem daraus durch ganzzahlige Teilung entstandenen feineren Raster entspricht.

4. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass unselektive Affinitätssorbentien verwendet werden, um Biomolekülgemische aufzureinigen.

5. Probenträger nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass kovalent oberflächengebundene Alkanketten als Affinitätssorbentien verwendet werden.

6. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass für eine Vorauswahl bestimmter Biosubstanzgruppen und zu ihrer Aufreinigung selektive Affinitätssorbentien verwendet werden.

7. Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass zunächst ein Probenträger mit hydrophiler, ebener Oberfläche hergestellt wird, und dass die Belegungen mit lyophoben oder affinitätssorptiven Schichten nach jeweiligem Bedrucken der zu schützenden Flächen mit einem wiederauflösbaren Druckfarbstoff vorgenommen wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bedrucken durch ein Siebdruckverfahren erfolgt.

9. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bedrucken durch einen Druckvorgang erfolgt, bei dem die Druckfarbe in Form von Tröpfchen aufgeschossen wird.

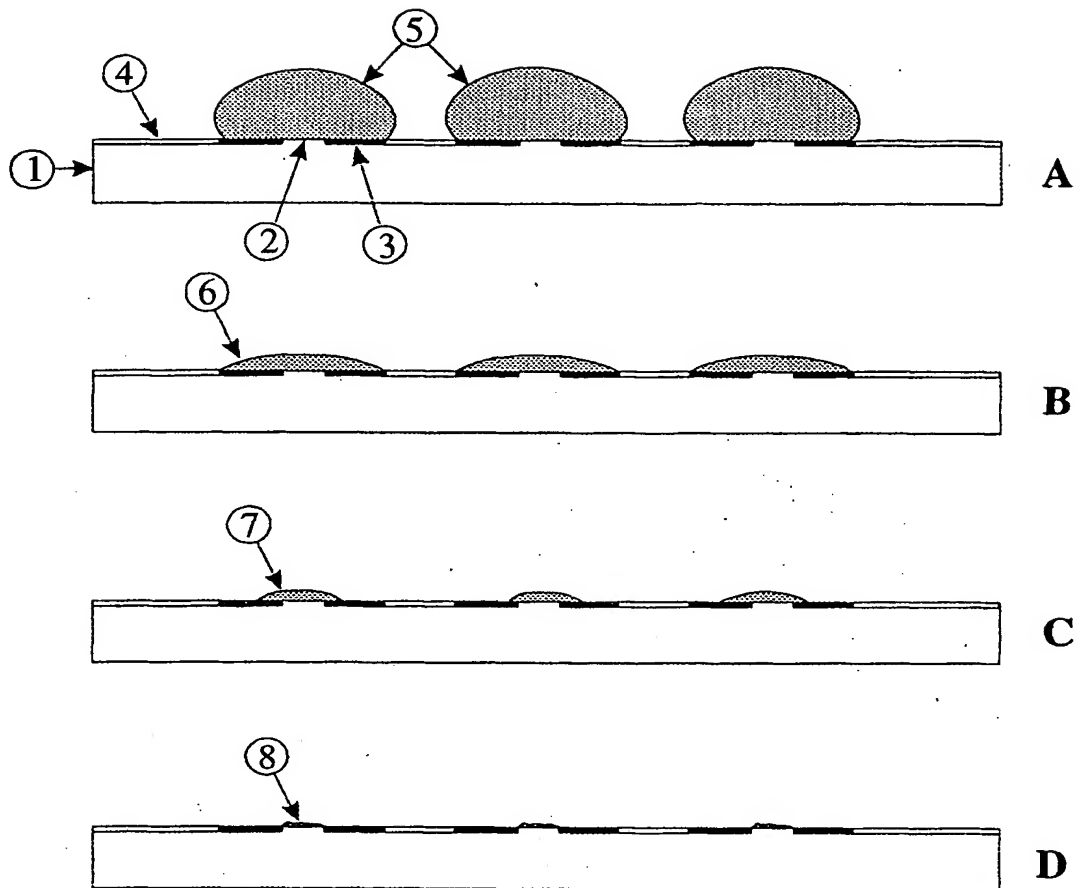
10. Verfahren zum Belegen eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 6 mit Biomolekülproben für eine nachfolgende massenspektrometrische Analyse mit Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI), **dadurch gekennzeichnet**,

dass zunächst auf die hydrophilen Ankerbereiche Lösungen mit weitgehend ungereinigten Biomolekülproben in Form von Tropfen aufgebracht werden, die auch die Bereiche mit Affinitätssorbens überdecken, wobei die analytisch interessanten Biomoleküle an der Schicht mit Affinitätssorbens gebunden werden, dass danach die Probenträgerplatte gewaschen und getrocknet wird, wobei die analytisch interessanten Biomoleküle gebunden bleiben, und

dass danach Tropfen mit eluierender Matrixlösung aufgebracht werden, wodurch beim Auftrocknen dieser Lösung auf den hydrophilen Ankerbereichen Matrixkristalle entstehen, in die zumindest ein Teil der Bio-

moleküle eingebunden sind.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen



Abbildungen 1A, 1B, 1C und 1D